MycAssay™ Pneumocystis
Stratagene Mx3000 Serie
Respiratorische Proben
REF 080-035

Vorgesehener Verwendungszweck

MycAssay™ Pneumocystis ist vorgesehen für die Verwendung durch qualifiziertes Laborfachpersonal zum qualitativen Nachweis genomischer DNA von *Pneumocystis jirovecii*, die aus Patientenproben des unteren Respirationstrakts (z. B. BAL- oder Bronchialaspiratproben) zur Abklärung der Diagnose bei erwachsenen Patienten, bei denen eine durch *Pneumocystis jirovecii* verursachte Lungenentzündung vermutet wird.

MycAssay™ Pneumocystis wurde für den Gebrauch mit den Real-Time-PCR-Thermocyclern der Modellreihe Mx3000 – Mx3000P® oder Mx3005P® – von Stratagene in Verbindung mit der MxPro-Software (Version 4.10) validiert.

Informationen zum Test

Die durch *Pneumocystis jirovecii* (früher *carinii*) ausgelöste Pneumonie (PCP) ist eine verbreitete opportunistische Pneumonie in abwehrgeschwächten Patienten, insbesondere solchen mit fortgeschrittener HIV-Infektion und AIDS[1]. Sie ist typischerweise ambulant erworben, stellt sich subakut dar und führt, wenn sie unbehandelt bleibt, zu progressivem Lungenversagen und zum Tod[2]. Die Prophylaxe mit Trimethoprim-Sulfamethoxazol (Bactrim oder Septrin) wird routinemäßig vielen Risikopatienten verabreicht, eine Vorgehensweise, welche die Häufigkeit von PCP grundlegend verringert hat. Dennoch kann es zu einem Ausbruch kommen und Personen, die nicht wissen, dass sie HIV-positiv sind, können an AIDS mit PCP erkrankt sein[3]. PCP tritt auch bei anderen abwehrgeschwächten Patienten auf, darunter auch bei Empfängern eines Spenderorgans nach Organtransplantationen sowie bei Patienten mit Hypogammaglobulinämie oder chronischer Leukämie.

Gegenwärtig stützt sich die Diagnose von PCP auf mikroskopische Methoden, da *P. jirovecii* nicht in mikrobiologischen Routinelabors kultiviert werden kann. Bronchoalveoläre Lavage (BAL) ist die bevorzugte Methode der Probengewinnung. Zu den gängigen diagnostischen Verfahren gehören die Immunfluoreszenz (IF) oder die direkte Fluoreszenz sowie die histologische Anfärbung der Proben.[4]

MycAssay™ Pneumocystis ist ein molekulardiagnostischer Kit für den Nachweis von *P. jirovecii*, der auf der sogenannten Molecular-Beacon-PCR-Technologie[5] basiert. Der gesamte Test kann – inklusive der DNA-Extraktion aus der klinischen Probe – innerhalb von vier Stunden oder, falls die extrahierte DNA bereits vorliegt, in nur zwei Stunden durchgeführt werden. Dieser Assay weist den unmittelbaren Vorteil der verbesserten Nachweisbarkeit im Labor auf, was in Kombination mit der schnellen Testdurchführung sehr wahrscheinlich einen klinischen Nutzen mit sich bringt. Die diagnostische Genauigkeit des Assays hängt in hohem Maße von der Qualität der Ausgangsprobe (Primärprobe) ab.

Testprinzip

Nach dem Mischen der Reagenzien des MycAssay™ Pneumocystis-Kits mit einer Probe, die die *Pneumocystis*-DNA-Zielsequenz (ein Abschnitt der großen mitochondrialen Ribosomen-Untereinheit von *Pneumocystis*) enthält, erfolgt die DNA-Amplifikation im Thermocycler. Der Assay enthält außerdem eine interne Amplifikations-Kontrollsequenz (IAC) – ein DNA-Fragment, das weder in *Pneumocystis* noch in anderen Pilz- oder Bakteriengenomen und auch nicht im menschlichen Genom vorkommt –, um inhibitorische Substanzen im PCR-Ansatz nachzuweisen und die Funktionalität der Assay-Reagenzien zu bestätigen.

Zum Nachweis der amplifizierten DNA-Zielsequenzen dienen die Molecular Beacons: einzelsträngige Oligonukleotid-Hybridisierungssonden, die eine Stamm-Schleifen-Struktur (engl. stem-and-loop structure) bilden. Die Schleife enthält eine zu einer Zielsequenz komplementäre Sondensequenz und der Stamm (Sequenzstrang) wird durch die Anlagerung der komplementären Armsequenzen gebildet, die an jeder Seite der Sondensequenz lokalisiert sind. Das Ende des einen Arms ist kovalent mit einem Fluorophor, der bei Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge fluoresziert, verbunden,

[1] Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, Huang L, Beard CB, Kaplan JE. (2004). Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis: 10: 1713-20.
[2] Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG. Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii.* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. Thorax 2006; 61:716-21.
[3] Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. JAMA: 286: 2450-60.
[4] Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM; ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). Proc Am Thorac Soc 2006;3:655-64.
[5] Tyagi S, Kramer FR. (1996). Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. Nature Biotechnology: 14: 303-308.

während das Ende des anderen Arms – ebenfalls über eine kovalente Bindung – ein Quencher-Molekül trägt, das die Fluoreszenz des Fluorophors unterdrückt, solange es sich in unmittelbarer Nähe befindet. Die Molecular Beacons fluoreszieren nicht, wenn sie frei in der Lösung vorliegen. Wenn sie jedoch mit einem Nukleinsäurestrang hybridisieren, der eine Zielsequenz enthält, erfolgt eine Konformationsänderung, die ihre Fluoreszenz ermöglicht. Der Umfang der Fluoreszenz, d. h, die Intensität des Signals, in irgendeinem bestimmten Zyklus, oder nach der Beendigung der Zyklen, hängt von der Menge der spezifischen Amplicons ab, die zu diesem Zeitpunkt vorhanden sind. Das Stratagene Real-Time-PCR-System detektiert in Echtzeit die von jedem Beacon emittierte Fluoreszenz.

Vorsichtsmaßnahmen

- Der Kit ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.
- Dieser Kit darf nur von Laborfachpersonal verwendet werden. Es werden Testverfahren für die aerosolfreie Handhabung der Proben benötigt. Die Standard-Vorsichtsmaßnahmen und die Labor-Richtlinien sollten bei der Bearbeitung sämtlicher Proben beachtet werden. Ein Material-Sicherheitsdatenblatt kann von Myconostica Ltd. bezogen werden.
- Dieser Test ist ausschließlich für die Anwendung mit der Stratagene Mx3000 Serie und der MxPro-Software (Version 4.10) bestimmt.
- **Während der Validierungsstudien wurde Folgendes speziell bei diesem Gerät festgestellt:**
    - **Wenn das Gerät kurz zuvor verwendet wurden, sollten Sie die Lampe mindestens 1 Stunde abkühlen lassen, bevor Sie einen MycAssay™ Pneumocystis-Lauf vorbereiten, da es andernfalls zu einer Beeinträchtigung der Empfindlichkeit kommen kann, die zu falsch-negativen Ergebnissen führt.**
    - **Bei niedrigen Konzentrationen um den klinischen Cut-off-Wert herum ist eine geringere Präzision im Vergleich zu anderen von uns getesteten Geräten festzustellen.**
- Verwenden Sie keine Reagenzien oder Kontrollen, deren Schutzbeutel bei der Lieferung geöffnet oder beschädigt sind.
- Reagenzien und Kontrollen können nicht zwischen Kits mit unterschiedlichen Chargennummern ausgetauscht werden.
- Vereinigen Sie niemals Reagenzien oder Kontrollen aus unterschiedlichen Röhrchen, selbst wenn sie aus derselben Charge stammen.
- Verwenden Sie Reagenzien oder Kontrollen niemals nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Nach dem Öffnen sollten die Reagenzien und Kontrollen nicht wieder eingefroren oder wiederverwendet werden.
- Beim Umgang mit den Reagenzien des Kits sind Schutzkleidung und Einmal-Handschuhe zu tragen.
- Vermeiden Sie mikrobielle und Desoxyribonuklease-(DNase-)Kontaminationen der Reagenzien bei der Entnahme von Aliquoten aus den Röhrchen.
- Die Verwendung von sterilen, DNase-freien Low-Retention-Einmal-Filterpipettenspitzen oder Pipettenspitzen für Positive-Displacement-Pipetten wird empfohlen.
- Benutzen Sie für jede Probe und jedes Reagenz eine neue Pipettenspitze.
- Entsorgen Sie ungebrauchte Reagenzien und Abfälle gemäß den geltenden Bundes-, Landes- oder örtlichen Vorschriften.
- Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Pneumocystis- oder IAC-Amplicons sollten die Reaktionsgefäße nach der Amplifikation nicht mehr geöffnet werden.
- In Arbeitsbereichen, in denen mit Proben oder Kit-Reagenzien gearbeitet wird, darf nicht gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Lösungen mit einer niedrigen DNA-Konzentration können bei unsachgemäßer Lagerung instabil sein. Es wird empfohlen, die extrahierte DNA bei -80 °C zu lagern, um die DNA-Integrität zu erhalten. Wenn möglich, sollte wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren vermieden werden.
- Dieser Kit wurde mit optischen 8er-PCR-Röhrchen-Streifen (0,2 ml) und Deckeln (von Agilent Technologies, Kat.-Nr. 401428 und 401425) validiert. Der Gebrauch anderer Kunststoff-Materialien (oder von Artikeln anderer Hersteller) könnte zu anderen Schwellenwerten und daher zu anderen Leistungsmerkmalen als den in dieser Gebrauchsanleitung angegebenen führen. Bei Verwendung von Kunststoff-Verbrauchsmaterialien anderer Hersteller wird empfohlen, eine laborinterne Validierung mit den Positiv- und Negativkontrollen durchzuführen.

Kit-Inhalt

Beschreibung
Der Kit enthält fünf Folienbeutel mit jeweils drei verschlossenen Kompartimenten; die Beutel können separat verwendet werden. Jeder Beutel enthält genug Reagenzien für acht Reaktionen.

		Volumen
Röhrchen 1 (oranger Deckel)	dNTPs $MgCl_2$ Gepufferte Lösung mit DNA-Polymerasekomplex	66 µL
Röhrchen 2 (blauer Deckel)	< 0,01 % Primer < 0,01 % Molecular Beacons < 0,0001 % interne Amplifikationskontrolle (IAC) Die interne Amplifikationskontrolle ist ein rekombinantes DNA-Plasmid, das eine nicht-infektiöse Sequenz enthält, die mit keiner *Pneumocystis*-Zielsequenz übereinstimmt. Tris-HCl Puffer	66 µL
Röhrchen 3 (farbloser Deckel)	Negativkontrolle Wasser	25 µL
Röhrchen 4 (schwarzer Deckel)	Positivkontrolle < 0,0001 % Positivkontroll-DNA Die Positivkontroll-DNA ist ein rekombinantes Plasmid, das die *Pneumocystis*-Zielsequenzen enthält. Tris-HCl Puffer	25 µL

Der Kit enthält außerdem:
- Myconostica Protokoll-CD-ROM für den MycAssay™ Peumocystis-Test
- Gebrauchsanweisung
- Analysenzertifikat

Aufbewahrung

Der Kit sollte bis zum Verfallsdatum, das auf dem Etikett der Schachtel angegeben ist, eingefroren (-15 bis -25 °C) gelagert werden. Danach sollte er gemäß den örtlichen Bestimmungen entsorgt werden.

Sobald eine Verpackung geöffnet worden ist, ist der Inhalt unmittelbar zu verwenden und darf nicht nochmals eingefroren oder erneut verwendet werden.

Erforderliche Ausstattung/Materialien (nicht im Lieferumfang enthalten)

- Stratagene Real-Time-PCR-System der Modellreihe Mx3000 (inklusive Benutzerhandbuch, angeschlossenen Computers und MxPro-Software, Version 4.10)
- Optische PCR-Röhrchen-Streifen (Agilent Technologies, Kat.-Nr. 401428)
- Deckel für optische PCR-Streifen (Agilent Technologies, Kat.-Nr. 401425)
- Mikrozentrifuge mit passendem Adapter für 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße
- Laborschüttler (Vortex)
- Rack für PCR-Reaktionsgefäße
- Mikroliter-Pipetten (Volumenbereich: 7,5–20 µL)
- Sterile Low-Retention-Filter-Pipettenspitzen
- Einmal-Handschuhe, puderfrei
- Anwendereigene DNA-Dekontaminationslösung
- Permanent-Markerstift (für wasserfeste Beschriftung)
- DNA-Extraktions-Kit (siehe unten)

Probe

Als Ausgangsprobe für den MycAssay™ Pneumocystis-Assay wird Gesamt-DNA verwendet, die aus klinischen Patientenproben (BAL-Proben) extrahiert wurde. Für diesen Zweck werden der im Folgenden genannte DNA-Extraktions-Kit sowie die Adapterplatte für einen Laborschüttler (Vortex) empfohlen. Beides ist von Myconostica Ltd. erhältlich und wurde bei der Validierung verwendet:

- MycXtra® Pilz-DNA Extraktions-Kit (REF-Nr.: 080-005, bei Myconostica erhältlich)
- Laborschüttler Vortex-Genie 2 (von Scientific Industries Inc., New York, USA)

- Adapterplatte für Vortex-Laborschüttler (REF-Nr.: 080-015, bei Myconostica erhältlich)

Hinweise zur Durchführung

- Lesen Sie das gesamte Protokoll, bevor Sie mit der Durchführung beginnen.
- Die Durchführung des MycAssay™ Pneumocystis-Tests dauert (ohne DNA-Extraktion) ungefähr zwei Stunden, je nach Anzahl der zu analysierenden Proben.
- Das Ansetzen der Reaktionen für den Test sollte in einer PCR-Workstation oder in einem Labor, das räumlich vom PCR-Labor getrennt ist, durchgeführt werden. Falls eine PCR-Workstation nicht zur Verfügung steht, sollte das Ansetzen der Reaktionen in einem für PCR geeigneten Bereich des Labors[6], der regelmäßig mit DNA-Dekontaminations-Reagenzien gereinigt wird, erfolgen.
- Während des Ansetzens der Real-Time-PCR-Reaktionen sollten Sie allerdings keine DNA-Dekontaminationslösungen verwenden, da sie die Reaktionen hemmen könnten.
- Verwenden Sie Mikroliter-Pipetten für den Transfer von Flüssigkeiten. Für das Ansetzen der Reaktionen sollten separate Mikroliter-Pipetten verwendet werden, die regelmäßig dekontaminiert werden sollten.
- Es wird empfohlen, Low-Retention-Filter-Pipettenspitzen zu verwenden, um sicherzustellen, dass während des Ansetzens keine DNA verloren geht.
- **Vorsicht beim Umgang mit Röhrchen 4. Dieses enthält Template-DNA-Material, und eine Kontamination könnte zu falsch-positiven Testergebnissen führen.**
- Tragen Sie während der gesamten Prozedur Einmal-Laborhandschuhe.
- Alle Röhrchen müssen nach dem Gebrauch und vor der Entsorgung verschlossen sein.
- Notieren Sie sich sorgfältig die Probenpositionen, wenn mehrere Proben verarbeitet werden.
- Lassen Sie die Lampe bitte nach einem Lauf mindestens 1 Stunde lang abkühlen, bevor Sie MycAssayTM Pneumocystis vorbereiten, um das Auftreten falsch negativer Ergebnisse möglichst zu vermeiden. Nach dieser Abkühlphase benötigt die Lampe - wie in Abschnitt 1.1 weiter unten erwähnt - eine 20-minutige Aufwärmphase.

Testdurchführung

1. Ansetzen der Real-Time-PCR

1.1 Schalten Sie das Real-Time-PCR-System der Stratagene Mx3000 Serie (Gerät und zugehörigen Computer) ein und starten Sie die zugehörige MxPro 4.10 Software. Geben Sie, falls erforderlich, Nutzernamen und Passwort ein. Die Lampe benötigt 20 Minuten zum Aufwärmen. Starten Sie den Lauf erst, wenn die Lampe bereit ist.

1.2 Stellen Sie sicher, dass der Arbeitsbereich mit DNA-Dekontaminationslösung gereinigt und vollständig trocken ist; vermeiden Sie während des Ansetzens der Reaktionen die Verwendung dieser Lösung, da sie die PCR-Reaktionen inhibieren könnte.

1.3 Ein Beutel enthält jeweils eines der Röhrchen 1, 2, 3 und 4. Die Reagenzien in einem Beutel reichen für die Durchführung von acht Reaktionen. Mindestens eine Positivkontroll-Reaktion und eine Negativkontroll-Reaktion müssen pro Lauf mit durchgeführt werden, wobei die Reagenzien aus einer einzigen Kit-Charge stammen müssen. Daher können 6 Testproben mit einem Beutel analysiert werden. Falls mehr als sechs Patientenproben untersucht werden müssen, können mehrere Beutel verwendet werden, wobei die verwendeten Beutel aus derselben Kit-Charge stammen müssen. Maximal können 38 Patientenproben mit den fünf Beuteln eines Kits analysiert werden.

1.4 Berechnen Sie unter Berücksichtigung der folgenden Tabelle die Anzahl der benötigten Reaktionsansätze:

Anzahl Beutel	Maximale Anzahl an Patientenproben
1	6
2	14
3	22
4	30
5	38

1.5 Nehmen Sie die entsprechende Anzahl der Packungen aus dem Tiefkühlschrank. Einen Beutel, der nicht mehr dicht verschlossen ist, sollten Sie nicht verwenden. Falls die aus den Patientenproben gewonnenen DNA-Proben nach der Extraktion eingefroren wurden, entnehmen Sie auch sie aus dem Tiefkühlschrank.

1.6 Öffnen Sie die benötigte Anzahl an Beuteln und entnehmen Sie die Röhrchen. Wenn insgesamt mehrere Reagenzienbeutel für eine Analyse benötigt werden, aber nur ein Satz Positiv- und Negativkontrollen, dann brauchen Sie die Röhrchen 3 und 4 nur aus einem der Beutel zu entnehmen. **Mit Röhrchen Nr. 4 sollten Sie besonders vorsichtig umgehen. Es enthält Positivkontroll-DNA-Material und eine Kontamination könnte falsch-positive Testergebnisse verursachen.**

[6] Siehe beispielsweise Mifflin, T. E. (2003). Setting up a PCR Laboratory. *In* PCR Primer, 2nd Ed. (eds. Dieffenbach and Dveksler). Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. USA.

1.7 Lassen Sie die Röhrchen für 5–10 Minuten bei Raumtemperatur auftauen; vergewissern Sie sich, dass der Inhalt jedes Röhrchens vollständig aufgetaut ist, bevor Sie mit dem nächsten Schritt fortfahren. Mischen Sie den Inhalt der Röhrchen und die Patientenproben kurz auf einem Laborschüttler (Vortex). Zentrifugieren Sie anschließend kurz in einer Mikrozentrifuge, um den gesamten Inhalt vor Gebrauch vollständig am Boden der Röhrchen zu sammeln.

1.8 Setzen Sie die benötigte Anzahl PCR-Reaktionsgefäße in den Ständer.

1.9 Pipettieren Sie die Negativkontrolle immer zuerst, danach die Testproben. Als Letztes sollte immer die Positivkontrolle hinzugegeben werden.

1.10 Die zu pipettierenden Volumina der Reagenzien und DNA-Lösungen bzw. Proben sind in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Reagenz	**Reaktion**		
	Negativkontrolle	**Patientenprobe**	**Positivkontrolle**
Röhrchen 1 (oranger Deckel)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Röhrchen 2 (blauer Deckel)	7,5 µL	7,5 µL	7,5 µL
Röhrchen 3 (farbloser Deckel)	10 µL	-	-
Patientenprobe	-	10 µL	-
Röhrchen 4 (schwarzer Deckel)	-	-	10 µL
Gesamtvolumen	25 µL	25 µL	25 µL

1.11 Pipettieren Sie die Reagenzien in derselben Reihenfolge, wie sie in obiger Tabelle aufgelistet sind: Röhrchen 1, dann Röhrchen 2, anschließend die Template-DNA (Negativkontrolle, Testprobe oder Positivkontrolle). Entnehmen Sie die Aliquote aus Röhrchen 1 vorsichtig; die Flüssigkeit ist etwas viskos und kann eventuell an der inneren Kante des Röhrchens anhaften. Falls dies geschieht, zentrifugieren Sie nochmals kurz, um den Inhalt vollständig am Boden des Röhrchens zu sammeln, bevor Sie erneut versuchen, das gesamte Aliquot zu entnehmen.

1.12 Benutzen Sie für jeden Pipettiervorgang eine neue Pipettenspitze. Verschließen Sie nach Gebrauch jedes Röhrchen wieder und entsorgen Sie es – mitsamt dem eventuell verbliebenen restlichen Inhalt – unverzüglich in einen verschließbaren Behälter für klinische Abfälle. Nicht gebrauchte Reagenzien können nicht für spätere Verwendung aufbewahrt werden.

1.13 Seien Sie beim Pipettieren der Positivkontroll-DNA (Röhrchen 4) besonders vorsichtig und stellen Sie sicher, dass kein anderes Röhrchen oder Reaktionsgefäß damit kontaminiert wird. Verschließen Sie die Deckel der anderen Röhrchen bzw. Reaktionsgefäße, bevor Sie Röhrchen 4 öffnen; dies trägt dazu bei, das Risiko von Kreuzkontaminationen zu reduzieren.

1.14 Vergewissern Sie sich, dass die Deckel aller Reaktionsgefäße fest verschlossen sind. Notieren Sie sich die Positionen der Proben im PCR-Röhrchen-Streifen. Beschriften Sie das erste Röhrchen eines Streifens, falls mehr als ein Röhrchen-Streifen verwendet wird. Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße für 10 Sekunden in einer Mikrozentrifuge mit passendem Adapter für 0,2-mL-PCR-Reaktionsgefäße, um den Inhalt am Boden der Röhrchen zu sammeln. Überzeugen Sie sich durch visuelle Kontrolle, dass keine Blasen in den Reaktionsansätzen vorhanden sind.

1.15 Fahren Sie unverzüglich mit Abschnitt 2 fort. Die angesetzten MycAssay™ Reaktionen zum Nachweis von *Pneumocystis* sind für bis zu 60 Minuten stabil.

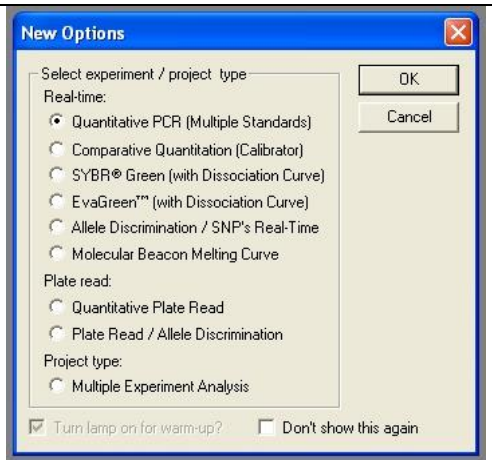
1.16 Stellen Sie sicher, dass der gesamte Arbeitsbereich im Anschluss an das PCR-Setup gründlich mit DNA-Dekontaminationslösung gereinigt wird.

2. Durchführung des Laufs

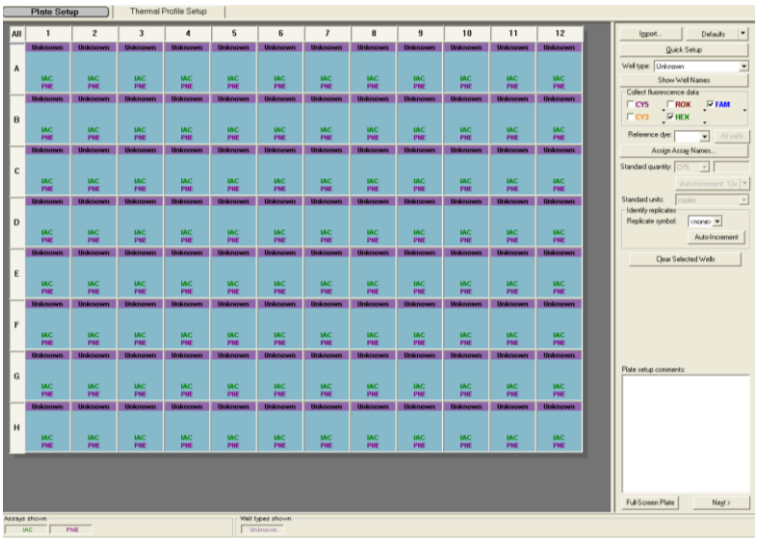
2.1 Öffnen Sie die MxPro-Software (Version 4.10).

2.2 Legen Sie die MycAssay Pneumocystis Protokoll-CD-ROM von Myconostica in das Laufwerk ein.

2.3 Wählen Sie im „**New Options**”-Menü die erste Option: „Real-time”: Quantitative PCR (Multiple Standards)” und klicken Sie auf „OK” (siehe Abb.):

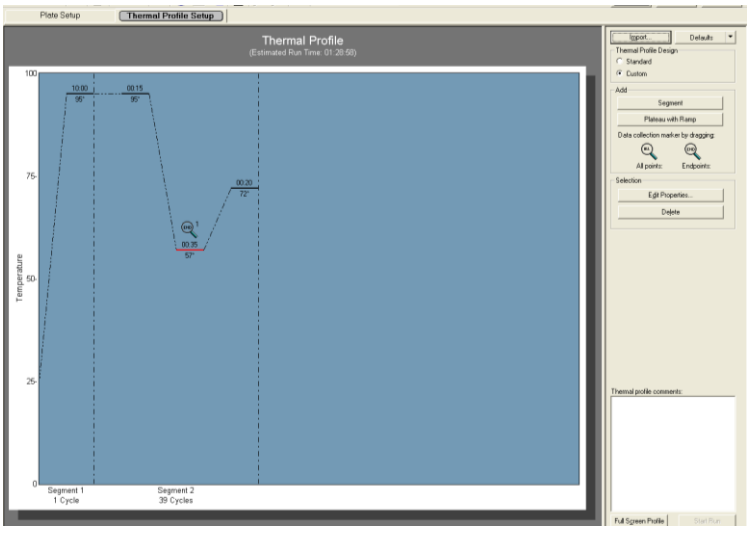


2.4 Klicken Sie in der Registerkarte „***Plate Setup***" auf die „**Import**"-Schaltfläche am rechten Bildschirmrand. Wählen Sie aus der Drop-down-Liste unter „**Look-In:**" die Option „**MycAssay PNE** Myconostica Protocol CD-ROM". Importieren Sie dann die Datei mit dem Namen „**MycAssay Pneumocystis v3_1.mxp**". Klicken Sie auf **Finish**. Im Anschluss daran sollte das „***Plate Setup***" wie im folgenden Beispiel aussehen:



2.5 Es wird empfohlen, für leere Wells/Röhrchen den Well-Typ auf „**Leer**" („**<blank>**" in der Drop-down-Liste „**Well Type**") einzustellen, um Interferenzen mit den Signalen aus den Wells/Röhrchen, in denen sich die Reaktionsansätze befinden, durch Lichtbrechungen – hervorgerufen durch den Kunststoff – zu vermeiden.

2.6 Wiederholen Sie den Import-Vorgang auf der „***Thermal Profile Setup***"-Registerkarte, um das PCR-Programm für diesen Assay zu importieren: Wählen Sie dazu unter „**Thermal Profile Design**" die Option „**Custom**" und importieren Sie dann über den „**Import**"-Befehl dieselbe Datei wie unter 2.4 beschrieben. Im Anschluss daran sollte die Einstellung des Temperaturprofils („***Thermal Profile Setup***") wie im folgenden Beispiel aussehen:



2.7 Benennen Sie auf der „***Plate Setup***"-Registerkarte die Wells/Röhrchen entsprechend: Klicken Sie mit der rechten Maustaste auf das zuvor markierte Well (oder bei Wiederholproben auf eine Gruppe von Wells/Röhrchen) und wählen Sie „**Well Information**" aus der Liste der verfügbaren Optionen. Tippen Sie den Namen der jeweiligen Probe im Eingabefeld „**Name:**" ein.

2.8 Wenn alle Wells/Röhrchen adäquat benannt sind, speichern Sie den Lauf unter einem geeigneten Dateinamen, der das Datum und das Bedienerkürzel enthält, ab und starten Sie den Lauf durch Anklicken der „**Run**"-Schaltfläche oben rechts auf der Registerkarte „**Instrument**" und anschließenden Mausklick auf „**Start**" unten rechts auf dem Bildschirm.

2.9 Denken Sie daran, dass das Gerät mindestens eine 1 Stunde lang abkühlen muss, bevor Sie wieder mit Schritt 1.1 beginnen können.

3. Auswertung der Daten und Interpretation der Ergebnisse

3.1 Nach Ende des Analysenlaufs können Sie die Ergebnisse betrachten, indem Sie auf die Schaltfläche „**Analysis**" oben rechts auf dem Bildschirm klicken und anschließend die „***Results***"-Registerkarte anklicken.

3.2 Bei ausgewählter „**Amplification Plots analysis area**" stellen Sie die Schwellenwerte („**Thresholds**") für jeden Kanal auf folgende Werte ein und sichern Sie diese durch Anklicken des Vorhängeschloss-Symbols.

PNE = 500
IAC = 100

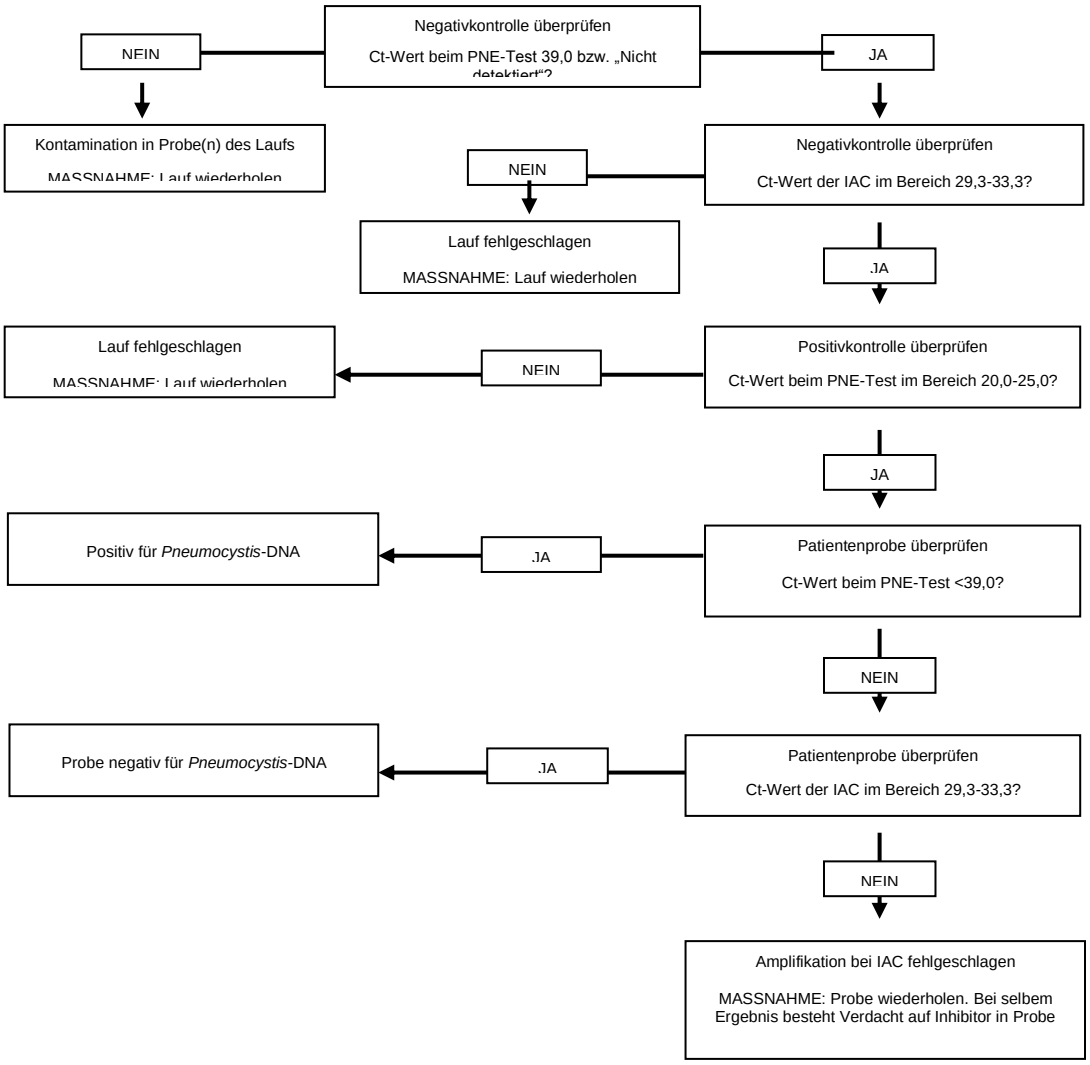
3.3 Die Option „**Adaptive Baseline**" sollte aktiviert sein (ist bei dieser Software in der Regel voreingestellt).

3.4 Speichern Sie die Änderungen. Sie können jeden Kanal einzeln betrachten, indem Sie die Kästchen im Bereich „**Assays Shown**" unten links auf dem Bildschirm aktivieren oder deaktivieren.

3.5 Zur Weiterverarbeitung können die Daten nach Excel exportiert werden. Wählen Sie dazu im „***File***"-Menü die Option „***Export Text Report***" und anschließend „***Export Text Report to Excel***". Nur die Ergebnisse der markierten Wells/Farbstoffe werden exportiert. Stellen Sie deshalb sicher, dass alle relevanten/erforderlichen Wells/Farbstoffe markiert sind.

3.6 Öffnen Sie die gespeicherte .csv-Datei mit Excel oder einem vergleichbaren Tabellenkalkulationsprogramm.

3.7 Werten Sie – mit den Kontrollen beginnend – jede Probe wie im folgenden Flussdiagramm gezeigt aus (weitere Details können auch der Tabelle unter dem Flussdiagramm entnommen werden).



Probe	Ct-Wert PNE MycAssay	Ct-Wert IAC MycAssay	Interpretation	Weitere Maßnahme
Negativkontrolle	39,0 oder „Nicht detektiert“	Im Bereich 29,3-33,3	Negativkontrolle akzeptabel	Ergebnisse der Patientenproben sind valide
Negativkontrolle	39,0 oder „Nicht detektiert“	< 29,3 oder > 33,3	Negativkontrolle fehlgeschlagen	Gesamten Lauf wiederholen
Negativkontrolle	<39,0	Im Bereich 29,3-33,3	Kontamination	Gesamten Lauf wiederholen
Positivkontrolle	Im Bereich 20,0-25,0	–	Positivkontrolle akzeptabel	Ergebnisse der Patientenproben sind valide
Positivkontrolle	< 20,0 oder > 25,0	–	Positivkontrolle fehlgeschlagen	Gesamten Lauf wiederholen
Patientenprobe	39,0 oder „Nicht detektiert“	Im Bereich 29,3-33,3	Probe ist negativ für *Pneumocystis*	Ergebnis speichern oder ausdrucken: Ergebnis 1
Patientenprobe	<39,0	–	Positiv für *Pneumocystis*	Ergebnis speichern oder ausdrucken: Ergebnis 2
Patientenprobe	39,0 oder „Nicht detektiert“	< 29,3 oder > 33,3	Amplifikation der IAC in der Probe fehlgeschlagen	Analyse der Probe wiederholen: Ergebnis 3

Siehe den Abschnitt „Klinische Befundung“ (bei Ergebnis 1, 2 oder 3).

4. Hinweise zur Fehlersuche

4.1 Die Negativkontrolle ergab ein positives Signal im FAM-Kanal:

- Beim Ansetzen kam es zu einer Kontamination. Die Ergebnisse des gesamten Analysenlaufs können nicht als zuverlässig angesehen werden.

→ Wiederholen Sie den gesamten Lauf; gehen Sie dabei mit besonderer Sorgfalt vor, wenn Sie die Templates – vor allem die Positivkontrolle (Röhrchen 4) – zugeben, um sicherzustellen, dass es nicht zu einer Kreuzkontamination kommt.

→ Vergewissern Sie sich, dass der Arbeitsbereich sowie Geräte und Hilfsmittel vor und nach Gebrauch auf korrekte Art und Weise dekontaminiert werden.

- Die Negativkontrolle befand sich nicht an der richtigen Position im Gerät.

→ Achten Sie darauf, allen Reaktionsansätzen in der Software die korrekte Bezeichnung zuzuweisen und die PCR-Röhrchen-Streifen in der richtigen Orientierung in das Gerät zu stellen.

- Es wurden eventuell nicht empfohlene PCR-Röhrchen oder -Platten verwendet.

→ Die Schwellenwerte sind nur bei Verwendung der empfohlenen PCR-Röhrchen-Streifen und Deckel von Agilent Technologies (Kat.-Nr. 401428 und 401425) gültig.

4.2 Der Ct-Wert der IAC in der Negativkontrolle liegt außerhalb des akzeptablen Bereichs:

- Die PCR wurde inhibiert.

→ Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsfläche sowie Geräte und Hilfsmittel nach der Anwendung von Dekontaminationslösungen und vor dem PCR-Setup völlig trocken sind.

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.

→ Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.

- Entweder wurde das Reagenz aus Röhrchen 1 oder 2 nicht zur PCR-Reaktion gegeben oder die doppelte Menge des Reagenzes aus Röhrchen 2 wurde pipettiert.

→ Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem höheren oder niedrigeren Flüssigkeitsstand in einem der Reaktionsgefäße – im Vergleich zu den anderen Gefäßen – erkennen.

- Es wurden eventuell nicht empfohlene PCR-Röhrchen oder -Platten verwendet.

→ Die Schwellenwerte sind nur bei Verwendung der empfohlenen PCR-Röhrchen-Streifen und Deckel von Agilent Technologies (Kat.-Nr. 401428 und 401425) gültig.

4.3 Das Ergebnis der Positivkontrolle ist negativ oder außerhalb des akzeptablen Bereichs:

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung“ dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.

→ Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.

- Es kam zu einem Fehler beim Ansetzen der Reaktion, und die Template-DNA der Positivkontrolle (Röhrchen 4) wurde in das falsche Reaktionsgefäß pipettiert.

→ Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem höheren Flüssigkeitsstand in einem Reaktionsgefäß und einem niedrigeren Flüssigkeitsstand in einem anderen Gefäß – im Vergleich zu den übrigen Gefäßen – erkennen.

- Das Reagenz aus Röhrchen 1 oder aus Röhrchen 2 wurde nicht zur Reaktion pipettiert.

→ Wiederholen Sie den Lauf; führen Sie dabei das Ansetzen der Reaktionen mit großer Sorgfalt durch. Derartige (Pipettier-)Fehler kann man an einem niedrigeren Flüssigkeitsstand in diesem Reaktionsansatz – im Vergleich zu den anderen Gefäßen – erkennen.

- Die Positivkontrolle befand sich nicht an der richtigen Position im Gerät.

- → Achten Sie darauf, allen Reaktionsansätzen in der Software die korrekte Bezeichnung zuzuweisen und die PCR-Röhrchen-Streifen in der richtigen Orientierung in das Gerät zu stellen.
- Es wurden eventuell nicht empfohlene PCR-Röhrchen oder -Platten verwendet.
- → Die Schwellenwerte sind nur bei Verwendung der empfohlenen PCR-Röhrchen-Streifen und Deckel von Agilent Technologies (Kat.-Nr. 401428 und 401425) gültig.

4.4 Bei Patientenprobe(n) erscheint „IAC failure":

- Wahrscheinlich enthält die aus der/den Testprobe(n) extrahierte DNA PCR-Inhibitoren.
- → Wir empfehlen, die DNA mit dem MycXtra™ Pilz-DNA Extraktions-Kit (MycXtra™ Fungal DNA Extraction Kit) zu isolieren.

4.5 In keinem Kanal wird ein Ergebnis erhalten – weder bei einer Probe noch bei den Kontrollen:

- Die Bedingungen, unter denen der Kit gelagert wurde, entsprachen nicht den Angaben im Abschnitt „Aufbewahrung" dieser Gebrauchsanweisung oder das Verfallsdatum des Kits ist abgelaufen.
- → Überprüfen Sie bitte, dass der Kit unter korrekten Bedingungen gelagert wurde. Überprüfen Sie das Verfallsdatum der Reagenzien (siehe Kit-Schachtel oder Etikett auf Reagenzienbeuteln) und wiederholen Sie den Lauf ggf. mit einem Kit, dessen Verfallsdatum noch nicht abgelaufen ist.
- Das verwendete Gerät arbeitet nicht optimal.
- → Überprüfen Sie bitte, dass Ihr Real-Time-PCR-Gerät über eine regelmäßig aktualisierte Wartungs-Historie verfügt und vollständig kalibriert wurde, so wie dies in der zugehörigen Installations- und Wartungsanleitung beschrieben ist.
- Beim Software-Setup wurde die falsche Protokolldatei verwendet.
- → Beachten Sie die Angaben in Abschnitt 2 und wählen Sie von der **Myconostica Protokoll-CD-ROM** die korrekte Protokolldatei, die für die betreffende Software in der jeweiligen Version angegeben wird. Nur die Datei, die der installierten Software entspricht, kann geladen werden. Wiederholen Sie den Lauf mit der richtigen Protokolldatei.

Wenn Sie weitere Fragen haben oder Hilfe bei Problemen benötigen, setzen Sie sich bitte mit unserem Technischen Kundendienst (productsupport@lab21.com) in Verbindung.

Leistungsmerkmale und Anwendungsgrenzen

Analytische Leistungsdaten für Thermocycler der Modellreihe Mx3000

Dieser Kit wurde ursprünglich mit einem Cepheid Smartcycler® Real-Time-PCR-System validiert. Einige der angegebenen Leistungsmerkmale des Assays wurden mit der Geräteplattform Mx3005P® und unter Verwendung optischer PCR-Röhrchen mit Deckel (von Agilent Technologies, Kat.-Nr. 401428 und 401425) erneut validiert. Diese Untersuchungen sind im Folgenden wiedergegeben.

Analytische Sensitivität

Unter Verwendung des oben beschriebenen Protokolls (Abschnitt „Testdurchführung:") und eines bei Myconostica hergestellten rekombinanten *Pneumocystis*-DNA-Moleküls wurde eine Nachweisgrenze (LoD) für *Pneumocystis* von < 50 Kopien bestimmt. Dieser Wert wurde mithilfe einer rekombinanten Plasmid-DNA, in die die Zielsequenz integriert war, ermittelt. Da die *Pneumocystis*-Zielsequenz aus den Mitochondrien stammt, liegen zahlreiche Kopien pro Zelle vor; die genaue Anzahl ist aber nicht bekannt.

Die folgenden Daten zur Leistungscharakteristik wurden unter Verwendung des Cepheid SmartCycler® Real-Time-PCR-Systems erhalten.

Analytische Selektivität

Die analytische Selektivität wurde mit DNA-Proben untersucht, die aus einer Fülle verschiedener Pilz- und Nicht-Pilz-Spezies extrahiert worden waren. Bei folgenden Spezies wurde kein positives Ergebnis erhalten:

Alternaria alternata, Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, A. terreus, Blastomyces capitatus, Candida albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, Cladosporium spp., Cryptococcus neoformans, Doratomyces microsporus, Fusarium solani, Rhizomucor pusillus, Rhodotonila rubra, Saccharomyces cerevisiae, Scedosporium apiospermum, S. prolificans, Sporothrix schenkii, Trichosporon capitatum. Auch für die folgenden Bakterienspezies wurde kein positives Ergebnis erhalten: *Bordetella pertussis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacillus plantarum*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*.

Humane genomische DNA ergibt in diesem Assay ebenfalls kein positives Ergebnis.

Interferierende Substanzen (Gegenanzeigen für die Anwendung)

Die folgenden Substanzen wurden in klinisch relevanten Konzentrationen getestet; für keine von ihnen wurde eine Inhibition des Assays festgestellt: Acetylcystein, Amphotericin, Beclometason-Dipropionat, Budesonid, Natrium-Colistimethat, Fluticasonpropionat, Formoterolfumarat-Dihydrat, Ipratropiumbromid, Lidocain, Mannitol, Salbutamolsulfat, Salmeterol, Septrin (Trimethoprim/Sulfamethoxazol), Natriumchlorid, Natrium-Cromoglicat, Terbutalin und Tobramycin.

Leistungsbewertung

Der klinische Cut-off bei einem Ct-Wert von 39,0 wurde anhand der Analyse eines Set von klinischen Proben, die aus verschiedenen Patientenpopulationen stammten, bestimmt.

Zur Leistungsbewertung des MycAssay™ Pneumocystis-Kits wurden in zwei Kliniken Proben durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) gewonnen. Aus diesen wurde dann unter Verwendung des MycXtra® Pilz-DNA Extraktions-Kits die DNA extrahiert, die anschließend gelagert und dann im Assay analysiert wurde. Die erhaltenen PCR-Ergebnisse wurden mit denen der Immunfluoreszenzmikroskopie verglichen.

PCR vs. mikroskopische Diagnose

	Mikroskopie positiv	Mikroskopie negativ		
PCR positiv	45	8	0,85	PPW
PCR negativ	2	33	0,94	NPW
	0,96	0,80		
	Sensitivität	Spezifität		

Tabelle 1: Diagnostische Spezifität und Sensitivität des MycAssay™ Pneumocystis-Kits im Vergleich zur Immunfluoreszenzmikroskopie.

Die in Tabelle 1 wiedergegebenen Daten entstammten Proben, die Patienten mit diagnostizierter HIV-Infektion, Patienten ohne HIV-Infektion und Patienten mit unbestimmtem HIV-Status entnommen worden waren. Bei Patienten mit einer *Pneumocystis*-Pneumonie können stark variierende Mengen an Organismen nachgewiesen werden; je niedriger der Ct-Wert, desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass eine Erkrankung vorliegt. Bei Patienten mit HIV und *Pneumocystis*-Pneumonie wird tendenziell eine höhere Anzahl an Organismen nachgewiesen als bei Patienten, die nicht mit dem Virus infiziert sind; allerdings ist die Überlappung beträchtlich. Die Punktwolke („Scatter-Plot“) in der folgenden Abbildung 1 zeigt diese Überlappung. Der Vollständigkeit halber, da die Daten in Tabelle 1 auch Patienten mit unbekanntem HIV-Status einschlossen, wurde auch die Punktwolke für diese Gruppe in Abbildung 1 mit aufgenommen (siehe Säule 3).

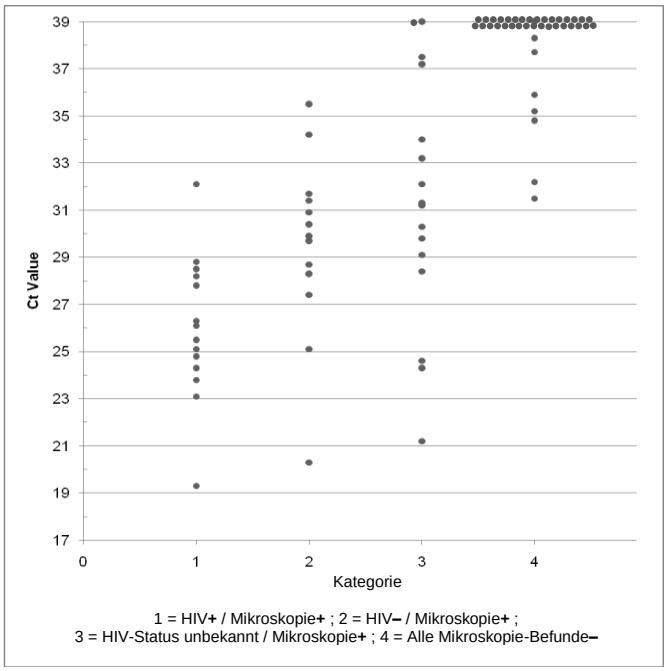


Abbildung 1: Punktwolke („Scatter-Plot“) mit den Ct-Werten der DNA-Proben, die aus Patientenproben des Respirationstrakts extrahiert wurden. Vier Patientengruppen sind beschrieben.

Klinische Befundung

Der MycAssay™ Pneumocystis-Kit ist als Hilfsmittel zur Diagnose einer *Pneumocystis*-Pneumonie vorgesehen. Die Ergebnisse müssen im Zusammenhang mit dem klinischen Zustand des Patienten und weiteren Ergebnissen diagnostischer Tests gesehen werden.

Nachfolgend werden Empfehlungen für Befundungen angegeben, wobei jede einzelne von der Interpretation der Assay-Ergebnisse abhängt.

Ergebnis-Ziffer „1“
„*Pneumocystis jirovecii* nicht nachgewiesen.“

Ergebnis-Ziffer „2“
„*Pneumocystis jirovecii* nachgewiesen.“ Positives Ergebnis. Ct-Wert angeben.“

Ergebnis-Ziffer „3“
„Test fehlgeschlagen. Anwesenheit von Inhibitoren oder anderen unbekannten Substanzen.“

Je niedriger der Ct-Wert ist, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Erkrankung vorliegt. Bei Ct-Werten nahe am Cut-off-Wert von 39,0 ist es eher wahrscheinlich, dass eine Kolonisation – und keine Infektion – vorliegt; aber bei einigen Patienten kann die Krankheit vorliegen, obwohl nur sehr wenig *P.-jirovecii*-DNA gemessen wird. Dies kann auf eine nicht geeignete Probe oder mangelhafte Probenvorbereitung hindeuten, oder die Belastung des betreffenden Patienten mit Pilzorganismen ist unklar oder komplexer Natur.

Grenzen des Verfahrens

- Die Grenzen des Verfahrens hängen in erster Linie von der Qualität der Primärprobe ab:
  - Ist sehr wenig Probenmaterial vorhanden oder stammt die Probe nicht aus dem betroffenen Lungenbereich, so wird der Test weniger sensitiv und kann falsch negative Werte liefern.
  - BAL-Proben sollten vor der DNA-Extraktion aus dem Pellet zentrifugiert werden.
  - Die Daten zeigten auch, dass durch eine Volumenreduktion des für die DNA-Extraktion verwendeten Überstands – wobei die Volumenreduktion durch den Zentrifugationsschritt erreicht wurde – die Menge an Inhibitoren, die in das Assay-System eingeschleppt werden, reduziert wird.
- Die Evaluation der klinischen Leistung wurde bisher nicht mithilfe des MX3005P®-Geräts bestätigt.

- Obwohl das MycXtra™ Pilz-DNA-Extraktionsverfahren so entwickelt wurde, dass PCR-Inhibitoren entfernt werden, sind nicht alle Medikamente oder Patientenpopulationen daraufhin evaluiert worden.
- Das Verfahren ist weder umfassend mit Sputum-Proben noch mit induzierter Kochsalzlösung oder mit Proben von Kindern evaluiert worden.
- Von außen eingetragene Kontaminationen der Originalprobe oder der Kit-Reagenzien können zu falsch-positiven Testergebnissen führen. Derartige Kontaminationen können durch mit *P. jirovecii* verunreinigte Luft, unsaubere experimentelle Arbeitstechnik beim Umgang mit der Positivkontrolle oder durch eine äußerliche Kontamination (insbesondere durch Pipetten) mit *P.-jirovecii*-DNA verursacht werden.
- Da ein richtig-positives Ergebnis bei Proben von Patienten, die vorübergehend oder dauerhaft mit *P. jirovecii* kolonisiert sind, erhalten werden kann, ist bei der Interpretation des Testergebnisses unbedingt eine klinische Beurteilung notwendig.

LIZENZIERUNG

TopTaq™ Hot Start wird von QIAGEN bezogen. QIAGEN® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland).

SmartCycler® ist ein eingetragenes Warenzeichen von Cepheid (904 Caribbean Drive, Sunnyvale, CA, 94089, USA).

Dieses Produkt wird unter der Lizenz des Public Health Research Institute, Newark, New Jersey, USA, verkauft und darf gemäß den PHRI-Patentrechten nur für die humane *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

Mx3000P® und Mx3005P® sind eingetragene Warenzeichen von Stratagene. MxPro™ ist ein Warenzeichen von Stratagene.

IVD

Lab21,184 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0GA , United Kingdom.
Telephone: +44 (0) 1638 552 882 Facsimile: +44 (0) 1638 552 375
Email: productsupport@lab21.com

CE